

PRODUKSI DAN UJI AKTIVITAS SELULASE DARI ISOLAT BAKTERI SELULOLITIK SUNGAI INDRAGIRI

Kiki Apriani, Yuli Haryani, Ganis Fia Kartika

Mahasiswa Program Studi S1 Kimia
Bidang Biokimia Jurusan Kimia
Bidang Analitik Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau
Kampus Binawidya Pekanbaru, 28293, Indonesia
qy.apriani@gmail.com

ABSTRACT

Cellulolytic bacteria has been isolated from water and sediment sample of Indragiri river waters. Cellulase was produced by cellulolytic bacterial isolates in 1% Carboxy Methyl Cellulose (CMC) liquid medium at 37°C, 150 rpm for 24 h. The specific activity of cellulase was determined by Nelson-Somogy's method (cellulase enzyme activity) and Lowry's method (protein concentration). 914-5 sedimen isolates showed the highest activity of the enzyme $12,246.10^{-4} \pm 0,5885.10^{-4}$ U/mL from 17 other isolates that was significantly different at ($P \leq 0,05$) compared with the other isolate.

Keywords: Bacteria, Carboxy Methyl Cellulose (CMC), cellulolytic, enzyme.

ABSTRAK

Bakteri selulolitik diisolasi dari air dan sedimen yang berasal dari 2 titik *sampling* di perairan Sungai Indragiri. Enzim selulase diproduksi oleh isolat bakteri selulolitik dalam media cair 1% *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) pada suhu 37°C, 150 rpm selama 24 jam. Aktivitas spesifik enzim selulase dari isolat bakteri selulolitik ditentukan dengan menggunakan metode Nelson-Somogy (aktivitas enzim selulase) dan kadar protein (metode Lowry). Isolat 914-5 sedimen memiliki aktivitas enzim selulase tertinggi dari 17 isolat lainnya, yaitu sebesar $12,246.10^{-4} \pm 0,5885.10^{-4}$ U/mL yang berbeda secara nyata pada ($P \leq 0,05$) dibandingkan dengan isolat lainnya.

Kata kunci: Bakteri, *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC), enzim, selulolitik.

PENDAHULUAN

Sungai Indragiri merupakan salah satu dari empat sungai yang ada di Provinsi Riau. Wilayah Sungai Indragiri melintasi tiga kabupaten yaitu, Kabupaten Indragiri Hulu, Kabupaten

Kuantan Singingi dan Kabupaten Indragiri Hilir. Pemanfaatan lahan di wilayah Sungai Indragiri sangat bervariasi, selain sebagai tempat pemukiman juga dimanfaatkan di bidang pertanian, perkebunan, perikanan dan peternakan. Hal ini memberikan

kontribusi terhadap pencemaran sungai tersebut. Pencemar Sungai Indragiri sebagian besar berasal dari limbah pemukiman, pertanian dan perkebunan berupa material tumbuhan yang terdapat di aliran air atau di sedimen sungai (Departemen Pekerjaan Umum, 2005). Material tumbuhan yang mencapai sedimen sungai memiliki ukuran butiran-butiran yang lebih besar sehingga dapat bergerak menggelincir dan menggelinding di atas lainnya pada dasar sungai hingga mencapai kedalaman tertentu dari lapisan dasar sungai (Mulyanto, 2007).

Material tumbuhan ini mudah sekali mengalami penguraian oleh bakteri dengan menggunakan oksigen terlarut dalam air (Sugiharto, 2005). Apabila jumlah material tumbuhan di sungai hanya sedikit, maka bakteri aerob mudah mengurainya tanpa mengganggu keseimbangan oksigen dalam air. Namun, jika jumlah material tumbuhan pencemar sungai cukup banyak, akan menyebabkan menurunnya kadar oksigen yang terlarut di dalam sungai, sehingga kehidupan di dalam air yang membutuhkan oksigen akan terganggu. Gas metana dan hidrogen sulfida yang dihasilkan dari proses penguraian oleh bakteri juga akan menimbulkan bau busuk pada sungai (Sastrawijaya, 2000).

Kerangka tumbuhan terutama disusun oleh selulosa. Selulosa cenderung untuk terhidrolisis menjadi glukosa menggunakan enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri selulolitik (Gupta dkk., 2011). Beberapa genus bakteri selulolitik yang dapat memproduksi enzim selulase secara efektif adalah *Bacillus*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Erwinia*, dan *Acetivibrio* (Singh dkk., 2013). Pada

penelitian sebelumnya selulase telah berhasil diproduksi dari bakteri selulolitik DAS Siak di Tandun Kabupaten Rokan Hulu menggunakan media produksi cair yang mengandung 1% *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) sebagai sumber karbon dengan waktu fermentasi 24 jam (Siagian, 2012).

Beberapa penelitian melaporkan bahwa proses hidrolisis secara enzimatik lebih menguntungkan daripada menggunakan asam. Proses hidrolisis secara enzimatik menghasilkan hasil lebih tinggi daripada hidrolisis yang dikatalis asam selain itu, tidak menimbulkan masalah korosi dan berlangsung pada kondisi *mild* dan suhu 50°C (Masfufatun, 2009). Hidrolisis selulosa yang terkandung dalam material tumbuhan menggunakan enzim selulase yang diproduksi dari bakteri selulolitik dapat mengatasi permasalahan pencemaran sungai dan menghasilkan produk bernilai ekonomis. Enzim selulase juga digunakan secara luas dalam berbagai bidang industri meliputi, bioetanol, tekstil, deterjen, pembuatan bir, serta industri *pulp and paper* (Ko dkk., 2013).

METODE PENELITIAN

a. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah Spektrofotometer UV-VIS (*Thermo Scientific Model Genesys 10S*), *Shaking Incubator* (*LabTech Model LSI-3016R Seri No. B110221102*), *Microcentrifuge* (*Heraeus Instrument. Biofuge Pico D-37520 Osterode*), Mikroskop (*Optic Iymen System No. 05141*) dan peralatan gelas laboratorium lainnya sesuai dengan prosedur.

Bahan-bahan yang digunakan adalah 17 isolat bakteri selulolitik Sungai Indragiri yang telah diisolasi di Laboratorium Biokimia, FMIPA, UR. *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) (Brataco Chemika J1438/4), reagen Nelson-Somogyi, dan reagen arsenomolibdat. Bahan-bahan lain yang digunakan adalah bahan tingkat analisis sesuai dengan metode kerja.

b. Pembuatan media cair produksi enzim selulase

Bahan-bahan yang digunakan sebagai media cair produksi enzim selulase adalah 1% CMC; 2 g KH_2PO_4 ; 0,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,3 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,001 g $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,3 g $\text{Co}(\text{NH}_2)_2$; 0,0092 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,003 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dan 0,0027 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Philippidis, 1991). Seluruh bahan dilarutkan dalam 1000 mL bufer fosfat 0,05 M (pH 7,0). Larutan tersebut disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 15 lbs selama 15 menit. Media siap diinokulasi apabila tidak ada tanda-tanda kontaminasi setelah didiamkan selama satu malam pada suhu kamar.

c. Produksi enzim selulase dalam media cair produksi enzim selulase

Sebanyak 17 Isolat bakteri selulolitik Sungai Indragiri masing-masing diinokulasikan sebanyak satu ose ke dalam 50 mL media *nutrient broth*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam dalam *shaking incubator* dengan kecepatan agitasi 120 rpm. Inokulum tersebut diukur kekeruhan sel bakterinya atau *Optical Density* (OD)

untuk memperkirakan jumlah sel dalam masing-masing inokulum pada panjang gelombang 660 nm. Inokulum dengan OD senilai 0,5 sebanyak 10% dari media produksi dimasukkan masing-masing ke dalam 100 mL media produksi enzim selulase, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam *shaking incubator* dengan kecepatan agitasi 150 rpm.

Masing-masing media produksi enzim yang terdapat kultur isolat didinginkan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C selama 1 jam, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit untuk mengendapkan biomassa bakteri dan supernatan disaring dengan *filter glass fiber* Whatman GF/C. Ekstrak kasar enzim ditambahkan NaN_3 hingga konsentarsi larutan 0,02% (b/v), jika ekstrak kasar enzim tidak langsung digunakan untuk analisis aktivitas enzim.

d. Penentuan kadar gula pereduksi metode Nelson-Somogyi

Analisis aktivitas enzim dilakukan menggunakan substrat 2% CMC. Sebanyak 0,5 mL substrat 2% CMC diinkubasi selama 5 menit dalam *waterbath* suhu 40°C kemudian ditambahkan 0,5 mL ekstrak kasar enzim dan aduk perlahan, dan inkubasi dilanjutkan selama 30 menit. Reagen Nelson-Somogyi ditambahkan sebanyak 0,5 mL. Tabung dipanaskan dalam penangas air selama 20 menit, selanjutnya ditambahkan 0,5 mL reagen arsenomolibdat, didiamkan selama 5 menit. Terakhir ditambahkan 3 mL akuades, didiamkan selama 30 menit. Absorbansi diukur pada $\lambda=540$ nm. Aktivitas enzim ekuivalen dengan gula pereduksi yang dihasilkan permilimeter (μmol gula pereduksi/mL menit).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tahap awal yang dilakukan untuk produksi enzim adalah penentuan *Optical Density* (OD) atau rapat optis untuk memperkirakan jumlah sel dalam masing-masing inokulum bakteri selulolitik. Menurut Maniatis dkk (1989) nilai OD dikorelasikan dengan OD_{660nm} 2 setara dengan $1,6 \times 10^9$ sel/mL. Bakteri yang diinokulasikan ke dalam media produksi enzim ODnya diusahakan sama yaitu OD_{660nm} 0,5. Volume inokulum dari media cair *Nutrient Broth* (NB) yang akan diinokulasikan yaitu 10% dari media produksi (Tabel 1).

Enzim selulase yang dihasilkan oleh ke-17 isolat adalah enzim yang diproduksi secara ekstraseluler. Komposisi media produksi enzim

selulase (KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O, (NH₄)₂SO₄, CaCl₂.2H₂O, CoCl₂.2H₂O, Urea, FeSO₄.7H₂O, MnSO₄.H₂O dan ZnSO₄.7H₂O) masing masing memiliki fungsi untuk aktivitas enzim selulase. Media produksi dilarutkan dalam buffer fosfat pH 7. Hal ini dilakukan karena aktivitas enzim dipengaruhi oleh pH (Poedjadi, 1994).

CMC pada media produksi berfungsi sebagai substrat, dan sekaligus sebagai zat penginduksi (induser) untuk menghasilkan enzim selulase. Induser adalah suatu senyawa yang dibutuhkan untuk menginduksi gen agar terjadi ekspresi gen, sesuai dengan teori Jacob-Monod tentang induksi enzim. CMC juga dimanfaatkan oleh bakteri selulolitik sebagai sumber karbon utama untuk menghasilkan glukosa.

Tabel 1. Nilai OD masing-masing inokulum dan volume yang dimasukkan ke dalam media produksi

Kode isolat	OD ₆₆₀	Jumlah sel/mL ($\times 10^9$)	Volume inokulum yang diinokulasikan ke media produksi (mL)
910-1 Air	1,492	1,1936	3,35
910-2 Air	1,559	1,2472	3,21
910-3 Air	1,424	1,1392	3,51
910-4 Air	1,572	1,2576	3,18
910-1 Sedimen	1,549	1,2392	3,23
910-2 Sedimen	1,221	0,9768	4,10
910-3 Sedimen	1,581	1,2648	3,16
910-4 Sedimen	1,463	1,1704	3,42
914-1 Air	1,546	1,2368	3,23
914-2 Air	1,463	1,1704	3,42
914-3 Air	1,364	1,0912	3,66
914-4 Air	1,532	1,2256	3,26
914-1 Sedimen	1,417	1,1336	3,53
914-2 Sedimen	1,188	0,9504	4,21
914-3 Sedimen	1,448	1,1584	3,45
914-4 Sedimen	1,509	1,2072	3,31
914-5 Sedimen	1,527	1,2216	3,27

Enzim selulase yang dihasilkan dalam media produksi cair dipisahkan dari sel menggunakan sentrifugasi dingin (4°C) untuk menghindari denaturasi enzim. Ekstrak kasar enzim ditambahkan larutan NaN₃ jika ekstrak kasar enzim tidak langsung digunakan untuk analisis aktivitas enzim.

Aktivitas ekstrak kasar enzim selulase dari ke-17 isolat ditentukan menggunakan metode Nelson-Somogyi. Absorbansi masing-masing larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 540 nm (Clark & Switzer, 1997). Data absorbansi yang diperoleh dapat menentukan konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan (Tabel 1.).

Sebanyak 17 isolat yang telah dianalisis kemampuan selulolitiknya memiliki kemampuan mereduksi gula dalam satuan waktu yang berbeda-beda. Isolat bakteri yang memiliki aktivitas selulolitik tertinggi adalah isolat 910-2 sedimen yaitu $12,246.10^{-4} \pm 0,5885.10^{-4}$ U/mL ekstrak kasar enzim (Tabel 2.) dan berbeda nyata dengan 16 isolat lainnya ($P \leq 0,05$). Perbedaan nilai aktivitas enzim selulolitik dari masing-masing isolat dapat disebabkan oleh sifat spesifik bakteri dalam mendegradasi selulosa (Meryandini, 2009). Hal ini dapat dilihat dari *Pseudomonas stutzeri* dengan aktivitas selulase sebesar 0,00166 U/mL dan *Pseudomonas cepacia* dengan aktivitas selulase sebesar 0,00075 U/mL (Marlinda, 2014).

Tabel 2. Aktivitas enzim dari 17 isolat bakteri selulolitik sungai Indragiri

No.	Kode Isolat	Aktivitas enzim ($\times 10^{-4}$ U/mL)
1	910-1 Air	6,031 \pm 0,1633 ^{gh}
2	910-2 Air	3,675 \pm 0,2825 ^j
3	910-3 Air	8,199 \pm 0,4895 ^{cd}
4	910-4 Air	4,241 \pm 0,4895 ^j
5	910-1 Sedimen	5,183 \pm 0,4322 ⁱ
6	910-2 Sedimen	12,246 \pm 0,5885 ^a
7	910-3 Sedimen	8,858 \pm 0,9928 ^c
8	910-4 Sedimen	3,958 \pm 0,0000 ^j
9	914-1 Air	7,634 \pm 0,0000 ^{de}
10	914-2 Air	1,131 \pm 0,2830 ^k
11	914-3 Air	6,503 \pm 0,2825 ^{fg}
12	914-4 Air	4,241 \pm 0,2830 ^j
13	914-1 Sedimen	6,974 \pm 0,4317 ^{ef}
14	914-2 Sedimen	1,602 \pm 0,3262 ^k
15	914-3 Sedimen	5,466 \pm 0,1633 ^{hi}
16	914-4 Sedimen	4,052 \pm 0,1633 ^j
17	914-5 Sedimen	10,932 \pm 0,1628 ^b

Catatan: nilai yang diikuti pangkat huruf yang berbeda adalah berbeda nyata pada tingkat 5 % ($p \geq 0,05$) berdasarkan *Duncan's New Multiple Range Test* (DNMRT)

KESIMPULAN

Isolat bakteri selulolitik Sungai Indragiri yang memiliki potensi untuk menghasilkan enzim selulase dengan aktivitas selulolitik tertinggi adalah isolat 910-2 Sedimen yaitu $12,246.10^{-4} \pm 0,5885.10^{-4}$ U/mL ekstrak kasar enzim (dan berbeda nyata dengan 16 isolat lainnya ($P \leq 0,05$).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ibu Dr. Christine Jose, M.Sc yang telah banyak meluangkan waktu memberikan bimbingan, dukungan, dan petunjuk selama penelitian dan penulisan karya ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Clark, J. M. and Switzer, R. L. 1977. *Experimental Biochemistry*. 2nd edition. WH. Freeman & Co. San Fransisco.
- Departemen Pekerjaan Umum. 2005. *Konsep Pola Pengelolaan Sumber Daya Air Wilayah Sungai Indragiri*. Departemen Pekerjaan Umum, Bandung.
- Gupta, P., Samant, K., and Sahu, A. 2012. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *International Journal of Microbiology*. 578925
- Ko, K. C., Lee, J. H., Han, Y., Choi, J. H., and Song, J. J. 2013. A novel multifunctional cellulolytic enzyme screened from metanogenic resource representing ruminal bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 441 (3): 576-572.
- Maniatis, T., Sambrook J., and Fritsch E.F. 1989. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, United States of America
- Marlinda, S. 2014. Uji aktivitas ekstrak kasar enzim selulolitik dan aktivitas spesifik dari beberapa bakteri endofit umbi tanaman dahlia (*Dahlia variabilis*). *Skripsi S-1*. Jurusan Kimia, FMIPA UR, Pekanbaru.
- Masfufatun. 2009. Isolasi dan karakterisasi enzim selulase. *Repository Universitas Wijaya Kusuma*. Fakultas Kedokteran, Universitas Wijaya Kusuma, Surabaya.
- Meryandini, A., Widosari, W., Maranatha, B., Sunarti, T. C., Rachmania, N., dan Satria, H. 2009. Isolasi bakteri selulolitik dan karakterisasi enzimnya. *Makara Sains*. 13: 33-38.
- Mulyanto, H.R. 2007. *Sungai Fingsi dan Sifat-Sifatnya*. Graha Ilmu, Yogyakarta.
- Philippidis, 1991. Evaluation of The Current Status of The Cellulase Production Technology. Biotechnology Research Branch,
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. UI-Press, Jakarta.

- Sastrawijaya, T. A. 2000. *Pencemaran Lingkungan*. Penerbit Rineka Cipta, Jakarta.
- Siagian, E. 2012. Isolasi bakteri selulolitik dari daerah aliran Sungai Siak di Tandun Kabupaten Rokan Hulu. *Skripsi S-I*. Jurusan Kimia, FMIPA UR, Pekanbaru.
- Singh, S., Moholkar, V. S., and Goyal, A. 2013. Isolation, identification, and characterization of a cellulolytic *Bacillus amyloliquefaciens* Strain SS35 from rhinoceros dung. *Hindawi Publishing Corporation*. 2013: 728134.
- Sugiharto. 2005. *Dasar-Dasar Pengolahan Air Limbah*. UI-Press, Jakarta.